



C A P Í T U L O 3

HIDROLISADOS PROTEICOS DE RESÍDUOS DE TILÁPIA: PRODUÇÃO, TIPOS E SUSTENTABILIDADE

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.782122512083>

Ligia Maria Neira

Instituto Municipal de Ensino Superior de Bebedouro "Víctorio Cardassi"
Taquaral, São Paulo, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4172348756813111>

Luiz Flávio José dos Santos

Faculdade de Tecnologia de Ribeiro Preto – São Paulo
Jaboticabal, São Paulo, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5888302973425312>

Joao Martins Pizauro Junior

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Câmpus Jaboticabal
Jaboticabal, São Paulo, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3958124498479090>

Dalton José Carneiro

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Câmpus Jaboticabal
Jaboticabal, São Paulo, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4172348756813111>

RESUMO: Considerando o aumento na produção de pescado oriundos da aquicultura, buscam-se dietas que sejam economicamente viáveis, ambientalmente não poluentes e que apresentem alta qualidade. A tilapicultura é a mais consolidada das criações de peixe no Brasil e seu processamento gera grande quantidade de resíduos. Com o seu aproveitamento, pode-se obter hidrolisado proteico, ingrediente que pode ser incorporado em dietas para peixes, apresentando alto valor biológico e sustentabilidade pela origem da matéria-prima, que seria poluente ambiental se não fosse utilizada como alimento. O atendimento das exigências nutricionais tem

o principal problema com a fração proteica das dietas, mais especificamente com o provimento de aminoácidos limitantes como os sulfurados, obrigando a utilização de alimentos proteicos de baixa disponibilidade e alto custo, como a farinha de pescado. A suplementação com aminoácidos cristalinos, muito empregada em nutrição de aves e suíños, não tem mostrado grande eficiência em peixes, principalmente pela grande facilidade em sua excreção através das brânquias, além de ocupar a maioria dos sítios de absorção com a oferta contínua destes nutrientes prontamente disponíveis. A própria silagem de resíduos apresenta o mesmo problema pela elevada proporção de aminoácidos livres. Considerando relevante a similaridade de sua composição com a da nova matriz proteica da tilápia, propomos o estudo da viabilidade de fracionamento da proteína da silagem de resíduos de tilápias por meio de avaliações dos processos da hidrólise da proteína e da eficiência de sua utilização de seus polipeptídeos em dietas práticas sobre o desempenho produtivo, nutricional e morfologia intestinal.

PALAVRAS-CHAVE: *Oreochromis niloticus*, proteína, fracionamento, peptídeos e nutrição.

PROTEIN HYDROLYSATES FROM TILAPIA WASTE: PRODUCTION, TYPES AND SUSTAINABILITY

ABSTRACT: Given the increase in fish production from aquaculture, a search is underway for economically viable, environmentally friendly, and high-quality diets. Tilapia farming is the most established fish farming method in Brazil, and its processing generates a large amount of waste. This process yields protein hydrolysate, an ingredient that can be incorporated into fish diets. It offers high biological value and sustainability due to the origin of the raw material, which would be an environmental pollutant if not used as feed. Meeting nutritional requirements is primarily a challenge with the protein fraction of diets, specifically the provision of limiting amino acids such as sulfur amino acids, requiring the use of low-availability, high-cost protein feeds like fish meal. Supplementation with crystalline amino acids, widely used in poultry and swine nutrition, has not shown great effectiveness in fish, primarily due to their ease of excretion through the gills and the fact that they occupy most absorption sites with the continuous supply of these readily available nutrients. Silage residue itself presents the same problem due to its high proportion of free amino acids. Considering the significant similarity of its composition to that of the new tilapia protein matrix, we propose studying the feasibility of fractionating the protein from tilapia silage residue by evaluating the protein hydrolysis processes and the efficiency of its polypeptide utilization in practical diets on productive performance, nutritional status, and intestinal morphology.

KEYWORDS: *Oreochromis niloticus*, protein, fractionation, peptides, and nutrition.

REVISÃO DE LITERATURA

A aquicultura moderna embasada em pilares como a produção lucrativa, a preservação do ambiente e o desenvolvimento social (McCausland et al., 2006) apresenta o desafio de moldar-se ao conceito de sustentabilidade, que implica agregar valores à produção de conhecimento e novas técnicas (Eler; Millani, 2007). Entre estas técnicas, evidencia-se a otimização do uso dos recursos naturais, das instalações e da mão de obra, a introdução de sistemas integrados de produção (como os policultivos), a racionalização do uso de insumos, principalmente na confecção de dietas, e o aproveitamento dos resíduos do beneficiamento (Tureck; Oliveira, 2003).

Na produção comercial de dietas para peixes é utilizada a farinha de pescado, ingrediente oneroso e de baixa disponibilidade na cadeia produtiva (FAO, 2010). Considerando que o aumento da produção mundial da aquicultura atinge 4% ao ano (FAO 2024) e que a farinha de pescados capturados permanece constante (FAO, 2022), os estudos atuais visam a sua substituição por outros ingredientes de maior disponibilidade e que proporcionem o mesmo desempenho produtivo (Naylor et al., 2009). A maioria dos resultados encontrados nestes estudos mostra que as fontes vegetais não preenchem nutricionalmente as exigências da espécie, e o principal problema está no provimento dos aminoácidos limitantes como os sulfurados, necessitando assim da suplementação com aminoácidos cristalinos (Hu et al., 2008; Abimorad et al., 2009; Bodin et al., 2012).

A suplementação com aminoácidos cristalinos, muito empregada em nutrição de aves e suínos, não se tem mostrado eficiente em peixes, principalmente pela grande facilidade em sua excreção através das brânquias, além de ocupar a maioria dos sítios de absorção com a oferta contínua de grandes proporções destes nutrientes disponíveis. Grande parte dos trabalhos conduzidos nesta linha de pesquisa mostra que o aumento da suplementação por aminoácidos cristalinos promove diminuição no desempenho, na eficiência de retenção de proteína e no consumo (Aoe et al., 1970; Zhang et al., 2006; Neira, 2013). A própria silagem de resíduos de pescado apresenta o mesmo problema quando usada como principal concentrado proteico em dietas, por conter elevadíssima proporção de aminoácidos livres. De acordo com Zarate e Lovell (1997), esta resposta baixa nos resultados pode ocorrer também pela perda por lixiviação dos aminoácidos cristalinos, por serem altamente solúveis no meio aquático, em relação aos ligados à proteína.

Um ingrediente de origem vegetal que vem recebendo atenção nas formulações de dietas para animais é o isolado proteico de soja, por apresentar adequado balanceamento em aminoácidos. É obtido a partir dos flocos ou da farinha de soja

desengordurada e contém, no mínimo, 90% de proteína (Martins, 2005). Mas sua utilização em alimentos para peixes geralmente tem sido limitada pelo seu alto custo (Richie et al., 2001), sendo uma alternativa pouco viável.

Segundo Sharp e Mariojouls (2012), as indústrias da pesca e da aquicultura produzem mundialmente 130 milhões de toneladas de resíduos de pescado por ano, que consistem em capturas em excesso, resíduos de bordo e industriais, e de desperdício doméstico. No Brasil, a situação é semelhante, pois a tilápia é a espécie de peixe de água doce mais industrializada, com produção de 155 mil toneladas (MPA, 2012) tendo seu rendimento médio dos filés de aproximadamente 30%, e os 70% restantes são considerados resíduos, incluindo cabeça, carcaça, vísceras, pele e escamas (Vidotti; Gonçalves, 2006).

Muitas são as opções de uso para os resíduos de pescado, mas a grande maioria delas não se mostra economicamente viável, em vista do elevado investimento inicial. Por outro lado, os aterros sanitários e lagoas de tratamento de efluentes não são alternativas recomendáveis, devido aos altos riscos de contaminação que podem provocar nas áreas costeiras ou água doce e pelo odor desagradável que produzem (Ferraz de Arruda, 2004). Uma opção viável para minimizar os problemas ambientais gerados pela quantidade elevada de resíduos de pescado é a sua transformação em um produto para ser incorporado como ingrediente nas dietas para animais (Ristic et al., 2002; Neira, et al., 2024), e desta forma colaborar no avanço da aquicultura que necessita de aumento correspondente no volume de alimento.

Os três métodos mais comuns para a utilização dos resíduos da aquicultura como ingredientes são a fabricação de farinha de peixe e/ou óleo, a fabricação de fertilizantes orgânicos ou a produção de silagem (FAO, 2010). A tecnologia de produção da silagem é simples (mesmo em larga escala), o capital de custo é pequeno, os efluentes e odores são reduzidos, não sendo necessário o armazenamento refrigerado, o processo de obtenção é rápido em climas tropicais e pode ser utilizado de imediato (Beerli et al., 2002). Segundo Kompiang (1981), a produção da silagem pode ser por ação de ácidos (silagem química), fermentação microbiana induzida por carboidratos (silagem biológica) e consequente ação de enzimas proteolíticas naturalmente presentes nos peixes, principalmente nas vísceras, ou adicionadas (silagem enzimática) na forma purificada, sendo mais onerosa, que realizam o processo de forma controlada (Viegas, 2002).

A silagem ácida de pescado, com pH entre 3,9 e 4,2, após a adição de ácidos minerais ou orgânicos, liquefaz-se suficientemente em quatro dias, a uma temperatura ambiente de 27°C a 30°C, conservando a atividade enzimática por muitos meses. Já as silagens biológicas são produzidas pelo processo de fermentação anaeróbica, utilizando microorganismos como os *Lactobacillus* e uma fonte de carboidratos. A

produção de ácido lático é importante por causar diminuição do pH (em torno de 4,0) (Vidotti; Gonçalves, 2006). O pH baixo propicia a ação das enzimas naturalmente presentes no pescado e/ou adicionadas, que são responsáveis pela hidrólise proteica, originando produto rico em proteínas, peptídeos de cadeia curta e principalmente aminoácidos livres (Goddard; Perret, 2005; Kompiang, 1981; Stone; Hardy, 1986). Além da acidez, acredita-se que a habilidade de certas bactérias ácido-láticas de produzir compostos antibacterianos (chamados bacteriocinas) colabora na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos (Borrensen, 1990).

A silagem de pescado é um ingrediente proteico de alta qualidade e pode ser utilizada como suplemento na dieta de vários animais, e os peixes não são exceção (Haard et al., 1985). Entre as vantagens, pode-se citar que este produto apresenta maior digestibilidade quando comparado à farinha de peixe (Hassan e Heath, 1987), mas, por apresentar alto grau de hidrólise, seus aminoácidos estão prontamente disponíveis, e não são aproveitados quando utilizados em grandes quantidades em dietas para peixes. Muitos autores acreditam que a silagem apresenta elevado potencial para a utilização na aquicultura pela sua semelhança com a matéria-prima em sua composição de aminoácidos (Fagbenro, 1994; Fagbenro e Jauncey, 1995a, 1995b; Goddard e Al-Yahyai, 2001; Vidotti et al., 2002).

Nutricionalmente, para melhorar a qualidade da silagem, alguns autores (Goddard e Al-Yahyai, 2001; Stone et al., 1989) observaram que controlando a hidrólise proteica, o valor nutricional do produto final do processo de ensilagem poderia ser superior ao excessivamente hidrolisado. Nestes trabalhos, o nitrogênio atribuído aos peptídeos era determinado pela subtração do nitrogênio amoniacial e dos aminoácidos livres do total de nitrogênio medido pelo método de titulação formal de Sorensen, tratando-se de uma análise pouco precisa, uma vez que esta é passível de erros acumulativos devido à manipulação durante as inúmeras fases desta metodologia.

O conceito de que os peptídeos menores são absorvidos pelo intestino dos vertebrados tem sido revisado (Adibi, 1997; Webb et al., 1992; Bier, 2003). Mas há evidências de que, em peixes, um único peptídeo pode ser mais eficientemente absorvido que uma mistura de aminoácidos idênticos (Boge et al., 1981; Reshkin; Ahearn, 1991). Porém, as informações sobre importância nutricional e metabólica da mistura de peptídeos ainda são inconclusivas e os estudos para peixes são escassos (Haard et al., 1985; Stone; Hardy, 1986; Stone et al., 1989). Neste âmbito, os estudos sobre a avaliação nas fases do processamento das silagens poderão contribuir para a obtenção de um produto que apresente maior eficiência nutricional, proporcionando maior ganho para as tilápias. Além da padronização de uma metodologia, para que possa ser usada em escala comercial pelas processadoras de pescado e utilizada nas indústrias de rações.

O material autolisado caracteriza-se por uma degradação da proteína original do produto da pesca, a estado de peptídeos e aminoácidos, em maior ou menor grau, dependendo da técnica empregada na sua elaboração (Meinke; Matil, 1973). A influência da temperatura sobre a reação enzimática é geralmente representada em termos de atividade ou velocidade de reação, ou seja, a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior, à medida que a temperatura aumenta, ocorrendo a perda da atividade biológica da enzima no processo de desnaturação térmica. As enzimas, quando sujeitas a baixas temperaturas, ficam inativas devido à falta de energia de ativação para provocar o choque entre as moléculas enzimáticas e as do substrato. No entanto, com o aumento gradual da temperatura, verifica-se também o aumento da atividade enzimática até se atingir um máximo de atividade na temperatura ótima. A partir desse valor, verifica-se uma diminuição da atividade até atingir um valor em que a enzima deixa de atuar devido à desnaturação da proteína que a constitui, perdendo sua configuração espacial e, por consequência, o centro ativo (Lehninger et al., 2007).

Embora seja certo que aminoácidos derivados de proteína da dieta são absorvidos pelos enterócitos na forma de peptídeos, pouco foi descrito sobre a sua importância quantitativa e qualitativa e o seu uso em dietas para organismos aquáticos. Mais do que pensar na substituição da farinha de peixe de uma maneira sustentável, a intenção original do projeto é descobrir um produto que garanta maior rentabilidade e menor impacto ao meio ambiente. A silagem com menor grau de hidrólise proteica é um ingrediente candidato a ser incorporado em dietas para peixes, pois, mesmo confeccionada a partir de resíduos de pescado que seriam poluentes ambientais, apresenta alto valor biológico devido às características da matéria-prima (Vidotti, 2002). Desta forma, as dietas balanceadas à base de peptídeos ou suplementadas com peptídeos ao invés de aminoácidos cristalinos poderão ser mais eficientes na resolução dos problemas de inadequação nutricional das rações formuladas para a produção de peixes.

REFERÊNCIAS

- ABIMORAD, E. G.; FAVERO, G. C.; CASTELLANI, D.; GARCIA, F.; CARNEIRO, D. J. *Dietary supplementation of lysine and/or methionine on performance, nitrogen retention and excretion in pacu Piaractus mesopotamicus reared in cages*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 295, p. 266–270, 2009.
- ADIBI, S. A. *The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function*. *Gastroenterology*, New York, v. 113, p. 332–340, 1997.

AOE, H.; MASUDA, I.; ABE, I.; SAITO, T.; TOYODA, T.; KITAMURA, S. *Nutrition of protein in Young carp. 1. Nutritive value of free amino acids*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 36, p. 407–413, 1970.

BEERLI, E. L.; LOGATO, P. V. R.; BEERLI, K. M. C. *Silagem ácida de resíduos de filetagem de trutas (Oncorhynchus mykiss)*. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA – SIMBRAQ**, 12., 2002, Goiânia. Anais.... Goiânia: UFG, 2002. v. 1, p. 6.

BIER, D. M. *Amino acid pharmacokinetics and safety assessment*. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, p. 2034S–2039S, 2003.

BODIN, N. et al. *Effects of fish size and diets adaptation on growth performance and nitrogen utilization of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss W.) juveniles given diets based on free and/or protein-bound amino acids*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 356–357, p. 105–115, 2012.

BOGE, G.; RIGAL, A.; PERES, G. *Rates of in vivo intestinal absorption of glycine and glycylglycine by rainbow trout (Salmo gairdneri R)*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, v. 69A, p. 455–459, 1981.

BORRENSEN, T. *Biotechnology, by products and aquaculture*. In: BLIGH, E. G. (Ed.). *Seafood science and technology*. Surrey: **Fishing News Books**, 1990. p. 278–287.

ELER, M. N.; MILLANI, T. J. *Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados à aquicultura*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, p. 33–44, 2007.

FAGBENRO, O. *Dried fermented fish silage in diets for Oreochromis niloticus*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, Israel, v. 46, n. 3, p. 140–147, 1994.

FAGBENRO, O.; JAUNCEY, K. *Water stability, nutrient leaching and nutritional properties of moist fermented fish silage diets*. **Aquaculture Engineering**, New York, v. 14, p. 143–153, 1995a.

FAGBENRO, O.; JAUNCEY, K. *Growth and protein utilization by juvenile catfish (Clarias gariepinus) fed dry diets containing co-dried lactic-acid-fermented fish-silage and protein feedstuffs*. **BioResource Technology**, New York, v. 51, p. 59–35, 1995b.

FAO. *Fisheries Global Information System (FAO-FIGIS)*. Rome, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/figis/en>>. Acesso em: [inserir data de acesso].

FAO (2022) **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. *The International Year of Artisanal Fisheries and Aquaculture OBJECTIVES OF THE YEAR*. NewsletterIslam, 2004b, (Iyafa 2022), p 2022. Available at: www.fao.org/artisanal-fisheries-aquaculture-2022

FAO (2024) Food and Agriculture Organization of the United Nations. ***The State of World Fisheries and Aquaculture 2024***. Rome: FAO; 2024. Available from: <https://www.fao.org/3/cc0461en/cc0461en.pdf>

FERRAZ DE ARRUDA, L. *Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos.* 2004. 78 f. **Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GODDARD, J. S.; AL-YAHYAI, D. S. S. *Chemical and nutritional characteristics of dried sardine silage*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, Binghamton, v. 10, n. 4, p. 39–50, 2001.

GODDARD, J. S.; PERRET, J. S. M. *Co-drying fish silage for use in aquafeeds*. ***Animal Feed Science and Technology***, Amsterdam, v. 118, p. 337–342, 2005.

HAARD, N. F. et al. *Stabilization of protein and oil in fish silage for use as a ruminant feed supplement*. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, Chichester, v. 36, n. 1, p. 229–241, 1985.

HASSAN, T. E.; HEATH, J. L. *Chemical and nutritive characteristics of fish silage produced by biological fermentation*. ***Biological Wastes***, London, v. 20, n. 3, p. 187–201, 1987.

HU, M. et al. *Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients with lysine and methionine supplementation to practical diets for gibel carp, *Carassius auratus gibelio**. ***Aquaculture***, Amsterdam, v. 275, p. 260–265, 2008.

KOMPIANG, I. P. *Fish silage, its prospect and future in Indonesia*. ***Indonesian Agricultural Research & Development Journal***, Jakarta Selatan, v. 3, n. 1, p. 9–12, 1981.

MARTINS, M. T. S. *Caracterização química e nutricional de plasteína produzida a partir de silagem pancreático de isolado proteico de soja*. ***Food Science and Technology***, Campinas, v. 25, n. 4, p. 683–690, 2005.

MCCAUSLAND, W. D. et al. *A simulation model of sustainability of coastal communities: aquaculture, fishing, environment and labour markets*. ***Ecological Modelling***, New York, v. 193, p. 271–294, 2006.

MEINKE, W. M.; MATTIL, K. F. *Autolysis as a factor in the production of protein isolates from whole fish*. ***Journal of Food and Science***, Chicago, v. 38, p. 864–867, 1973.

NAYLOR, R. L. et al. *Feeding aquaculture in an era of finite resources*. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, Washington, v. 106, p. 15103–15110, 2009.

NEIRA, L. M. *Fontes de lisina e metionina em dietas para tilápia do Nilo na fase de recría.* 2013. 58 f. **Dissertação (Mestrado) – Centro de Aquicultura**, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

NEIRA, L.M.; GONÇALVES, A.M.; BUZOLLO, H.; DE SANDRE, L.C.G.; DO NASCIMENTO, T.M.T.; COUTINHO, J.J.O.; PIZAURO JUNIOR, J.M.; D.J. CARNEIRO. *Effect of acid and fermented silage hydrolysis time on protein fractionation and digestibility for Nile Tilapia.* **Animal Feed Science and Technology**, Volume 318, 2024,116126, ISSN 0377-8401, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.116126>

RESHKIN, S. J.; AHEARN, G. A. *Intestinal glycyl-L-phenylalanine and L-phenylalanine transport in a euryhaline teleost.* **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 260, p. R563–R569, 1991.

RICHE, M. et al. *Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets.* **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 25, p. 181–194, 2001.

RISTIC, M. D.; FILIPOVIC, S. S.; SAKAC, M. L. J. *Liquid protein feedstuffs from freshwater fish byproducts as a component of animal feed.* **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 7, p. 729–736, 2002.

SHARP, M.; MARIOJOUIS, C. *Waste not, want not: Better utilization of fish waste in the Pacific. How is value added to fish waste?* **SPC Fisheries Newsletter**, Noustrea, v. 138, maio/ago., 2012.

STONE, F. E.; HARDY, R. W. *Nutritional value of acid stabilized silage and liquefied fish protein.* **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 37, p. 797–803, 1986.

STONE, F. E. et al. *Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdineri*).* **Aquaculture**, Amsterdam, v. 76, p. 109–118, 1989.

TURECK, C. R.; OLIVEIRA, T. N. D. E. *Sustentabilidade ambiental e maricultura.* **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 4, n. 2, 2003.

VIDOTTI, R. M.; CARNEIRO, D. J.; VIEGAS, E. M. M. *Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for pacu *Piaractus mesopotamicus*.* **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 33, n. 1, p. 57–62, 2003.

VIEGAS, E. M. M. *Processamento de pescados e aproveitamento de resíduos.* In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQÜICULTURA – SIMBRAQ**, 12., 2002, Goiânia. Conferências e palestras.... Goiânia, 2002. p. 79.

ZARATE, D. D.; LOVELL, R. T. Free lysine (*L*-lysine.HCl) is utilized for growth less efficiently than protein-bound lysine (soybean meal) in practical diets by young channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 159, p. 87–100, 1997.

ZHANG, Y. et al. Indispensable amino acid concentrations decrease in tissues of stomachless fish, common carp in response to free amino acid- or peptide-based diets. *Amino Acids*, New York, v. 31, p. 165–172, 2006.

WEBB, K. E.; MATTEWS, J. C.; DIRIENZO, D. B. Peptide absorption: a review of current concept and future perspectives. *Journal of Animal Science, Champaign*, v. 70, p. 3248–3257, 1992.